

## Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 13 (1)

February 2020

DOI: <http://dx.doi.org/10.36560/1312020828>

Article link

<http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=828&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



## Fertilidade dos gametas masculinos de *Lagerstroemia indica* L. por diferentes métodos de coloração

### Fertility of the male gametes of *Lagerstroemia indica* L. by different coloring methods

J. V. S. Alves, J. T. L. Abreu, C. B. M. Farias, L. P. N. Ramos, V. S. Melo, I. V. Karsburg

Universidade do Estado de Mato Grosso - *Campus* de Alta Floresta

Author for correspondence: [cynthia\\_bmf@hotmail.com](mailto:cynthia_bmf@hotmail.com)

**Resumo:** A *Lagerstroemia indica* L. é representante da família Lythraceae, é popularmente conhecida como extremosa, resedá rosa ou loucura. É uma árvore de pequeno porte de copa densa e decídua, medindo de 2 à 4m de altura, resistente a clima seco e as condições ambientais das cidades. O atual trabalho buscou avaliar a exequibilidade polínica da *Lagerstroemia indica* L., por meio dos corantes de Verde Malaquita 1%, Lugol 2% e Reativo de Alexander e do 2,3,5 cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC) nas diluições de 0,075% e 0,030%. Para a aferição da fertilidade polínica, foram usadas flores ainda fechadas de três populações de *Lagerstroemia indica* L., seguindo a metodologia de Guerra & Souza (2002), submetendo os tratamentos. Na aplicação do corante do TTC, foram dispostos anteras de botões frescos em duas concentrações: 0,075% e 0,30%, sendo avaliado nos períodos de 6:00h, 12:00h, 18:00h e 24:00h. O empregos dos colorantes R. de Alexander, V. Malaquita 1% e Lugol 2% e do TTC para determinação da exequibilidade polínica, mostrou-se eficientes na diferenciação dos pólenes férteis e inférteis da espécie. No uso do TTC recomenda-se utilização na solução de 0,30% durante 12h de fixação dos grânulos de pólen, período em que se obteve maior media de coloração.

**Palavras-chave:** Corantes, Estimativa polínica, TTC.

**Abstract:** The *Lagerstroemia indica* L. is representative of the family Lythraceae, is popularly known as extreme, reseda pink or madness. It is a small tree of small size, with height of 2 to 4 m of height, resistance to a dry climate and the environmental conditions of the cities. The present work sought a pollen feasibility of *Lagerstroemia indica* L., from the mediums of Green Malachite 1%, Lugol 2% and the Alexander Reactive and the 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) at the dilutions of 0.075% and 0.030%. In order to verify the pollen fertility, flowers were still closed with three variables of *Lagerstroemia indica* L., following the methodology of Guerra & Souza (2002), submitting the treatments. The application of the TTC dye, with anes of its application, can be done in two concentrations: 0.075% and 0.30%, the final evaluation being from 6:00 a.m., 12:00 p.m., 6:00 p.m. and 12:00 p.m. Emissaries of dyes from Alexander, Malaquita 1% and Lugol 2% and from TTC for the determination of pollen feasibility, conquer the differentiation of the fertile and infertile pollens of the species. In the use of TTC, a 0.30% solution is recommended during the 12 hours of fixation of the pollen granules, during which time the largest coloring medium is due.

**Keywords:** Dyes, Pollen Estimation, TTC.

### Introdução

A *Lagerstroemia indica* L. é membro da família Lythraceae, é conhecida como extremosa, resedá rosa ou loucura. É uma árvore de pequeno porte, copa densa e decídua, medindo de 2 à 4 m de altura, resistente a clima seco e as condições ambientais das cidades, além de crescimento rápido apresentam florescimento entre os meses de dezembro a março (LORENZO, 2012; OLIVEIRA; CARVALHO, 2010).

A alta produtividade de frutos está inteiramente relacionada com a capacidade da planta em gerar flores com gametas viáveis, assim estudos histológicos e histoquímicos abordam a que fertilidade masculina possibilita evidenciar sua potencialidade reprodutora (KEARNS e INOUE, 1993; MELO et al., 2016a).

Determinar as estratégias a serem adotadas em projetos de modificação gênica de plantas é fortemente influenciado pela biologia reprodutiva da espécie. Um dos fatores responsáveis pela

apuração de genótipos para a ciência de genética é os estudos sobre exequibilidade polínica. Tal método consiste em medidas de fertilidade masculinas, o que indicam o grau de estabilidade dos genótipos. (STIEHLALVES e MARTINS, 2008).

Diversos métodos são usados no estudo de fertilidade masculina, entre estes, o colorimétrico apresenta mais praticidade e baixo custo. Diversos trabalhos utilizam esta metodologia de coloração para estudos de exequibilidade de partículas polínicas, permitindo melhor distinção entre polens viáveis/inviáveis (MUNHOZ et al., 2008).

Neste sentido, a atual pesquisa buscou analisar a fertilidade das partículas de pólen de

*Lagerstroemia indica* L., por meio dos colorantes verde malaquita 1%, lugol 2%, corante de Alexander e 2,3,5 cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC), nas concentrações de 0,075% e 0,30%, visando fornecer informações sobre a fertilidade do pólen que auxilia nos processos de melhora da espécie.

## Métodos

O estudo ocorreu no Lab. de Citogenética e Cult. de T. Vegetais da UNEMAT em Alta Floresta - MT. As coletas sucederam-se em três diferentes pontos nessa mesma cidade (Tabela 1), no primeiro trimestre de 2018. As avaliações efetuaram-se a partir de botões de *L. indica* L.

**Tabela 1:** Identificação dos acessos, local de coleta dos botões de *L. indica* L. e dados de GPS.

População	Local de coleta	Coordenadas
P1	Rua NS6	Sul: 9° 84'55,40" Oeste; 56°07'32,92"
P2	Rua Paraíba	Sul: 9°85'31,60" Oeste; 56°06'52,39"
P3	Rua Florianópolis	Sul: 9°85'31,22" Oeste; 56°06'74,40"

Para a aferição da exequibilidade dos pólenes seguiu-se a metodologia aplicada por Guerra & Souza (2002). Os corantes utilizados foram: Lugol 2%, Verde Malaquita 1% e o Corante de Alexander.

Foram examinadas 10 lâminas por tratamento de cada população, fazendo-se a contabilização de 250 polens por repetição, perfazendo uma quantidade final de 90 lâminas analisadas contendo 22.500 pólenes.

Para o ensaio com o TTC, foram colhidos e usados botões florais frescos e posteriormente cortados de lado a lado com lâmina de corte para a retirar as anteras e macerá-las para liberação das partículas de pólen no tetrazólio em duas diluições: 0,075% e 0,30%. O material do estudo foi disposto em local de temperatura controlada de (23°C), em ambiente escuro e avaliado em diferentes períodos de contato com colorante: 6:00, 12:00, 18:00 e 24:00 horas.

No preparo das repetições foi utilizada uma gota do colorante por tratamento, as mesmas foram analisadas pelo procedimento de varredura, contabilizando 250 pólen por lâmina com dez repetições por ponto de coleta. Os pólenes considerados viáveis mostraram pigmentação da parede externa e do conteúdo interno de vermelho e inférteis não mostraram coloração.

Os resultados de fertilidade polínica estimada com os corantes: R. de Alexander, Lugol forte e V. malaquita 1% foram sujeitos ao exame de variância e os valores confrontados pelo método de Tukey ao nível de 5% de autenticidade, enquanto as médias de viabilidade para o corante TTC foram analisadas pelo teste scott-knott a nível de 5% de probabilidade. Todas as aferições foram feitas através do programa R, versão 3.3.2 (R CORE TEAM, 2016), com a ajuda do pacote ExpDes, versão 1.1.2 (FERREIRA et al., 2013).

## Resultados e discussão

Os testes de pigmentação utilizando os corantes R. de Alexander, Lugol e V. Malaquita para a quantificação da exequibilidade dos grãos polínicos de *L. indica* L., foram capazes de discernir os gametas férteis e inférteis através da coloração, conforme demonstrado na (Figura 1).

No emprego da solução de Alexander é possível observar que existiu diferença significativa na População 1 (Tabela 2), diferente das Populações 2 e 3 que apresentaram alta viabilidade. Schmitt et al., (2015), averiguando a fertilidade polínica de *Bixa orellana* L., obteve alta taxa de pólenes viáveis utilizando o respectivo corante.

Farias et al., (2018), examinando partículas de pólen da espécie Bisnagueira (*Spathodea campanulata*, Bignoniaceae), identificou que o colorante R. Alexander foi o que melhor estimou a capacidade de fertilizar os óvulos da planta, com valores de médias superiores a 76%, valores semelhantes podem ser encontrados para a espécie em estudo utilizando o mesmo pigmento.

Piccinini et al. (2012) estimou a fertilidade dos pólenes de capim-annoni (*E. plana*) usando a metodologia colorimétrica com Orceína acética 2% e R. de Alexander verificando que os mesmos apresentam alta capacidade de fecundidade, sendo o R. de Alexander o corante mais adequado para verificar a fertilidade polínica dessas plantas. Assim como o verificado no atual estudo o corante em questão mostrou um dos melhores para diferenciação de férteis/inférteis.

Para o uso do Lugol 2% foi possível verificar os pólenes de tons mais escuros foram classificados como férteis/viáveis e os de coloração mais fraca inférteis/inviável de acordo com a figura 1. Verificou-se que a exequibilidade polínica das três populações de *L. indica* L., não apresentaram diferença estatística, classificando-as como alta para a média 80,50% a 81,43%.

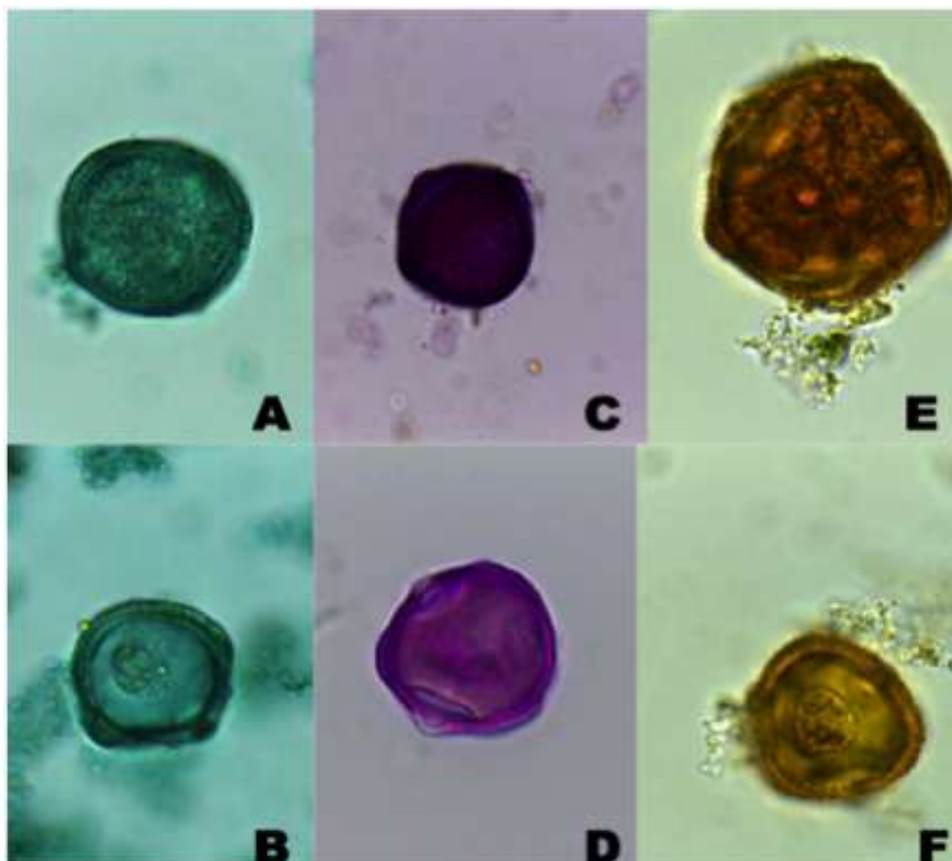
No uso do Verde Malaquita, todas as populações demonstraram elevado valor de

fertilidade e maior porcentagem quando comparado aos outros corantes sendo 82,57% (pop 1), 81,43% (pop 2), 82,03% (pop 3), (Tabela 2).

Os resultados de Lima et al. (2018), corroboram com os dados encontrados neste estudo com a espécie *L. indica* L, onde Lima et al. (2018), estudando a exequibilidade de *Apeiba tibourbou* com diferentes colorantes (R. de Alexander, Lugol 2%, Verde malaquita 1%) apurou que a planta tem alta viabilidade.

Na análise de viabilidade com uso da substância tetrazólio, foi possível observar que

houve desigualdade estatística expressiva entre as populações nas diferentes concentrações e tempo. Foi possível observar na concentração de 0,075% apenas a População 1 apresentou variação no tempo de 24h, configurando uma média de 8,96%, já População 3 na concentração 0,30%, o TTC diferiu no tempo de 6h, apresentando a menor média de viabilidade entre os diferentes tempos (Tabela 3).



**Figura 1.** Grãos de pólen de *Lagerstroemia indica* L., corados com: Verde Malaquita, a) viável b) inviável; Reativo de Alexander, c) viável d) inviável; Lugol 2%, e) viável f) inviável. Barra = 10 µm. **Fonte:** Os autores.

**Tabela 2.** Médias percentuais de viabilidade polínica em populações de *Lagerstroemia indica* L.

Corantes	Populações			CV (%)
	01	02	03	
Reativo de Alexander	75,83b	80,63a	82,57a	2,74
Lugol forte	80,50a	80,57a	81,43a	3,09
Verde malaquita 1%	82,57a	81,43a	82,03a	5,07

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem pelo teste Tukey a nível de 5% de significância.

Diferentemente dos valores encontrados por Mello et.al.; (2016a), com a espécie *Heliconia rostrata* Ruiz & Pavan onde foram verificados valores percentuais altos, acima de 95%, de fertilidade polínica com o uso do TTC nas concentrações de 0,075% e 0,30%.

A baixa fertilidade polínica apresentada na tabela 3 pode ser explicada conforme Martins et al. (2012), pelo fato de que a mesma pode variar entre indivíduos de uma mesma espécie ou de um

mesmo indivíduo já que esta é afetada por vários fatores como por exemplo a umidade relativa do ar, a temperatura do ambiente, a pressão osmótica do conteúdo intracelular, resistência da parede celular e desidratação da célula reprodutiva masculina, período de florescimento, alterações no ambiente como nutrição e ou stress da planta.

Uma outra possível explicação para esse fenômeno pode ser que o TTC é absorvido pelo lipídeo componentes da célula. Brown (1954)

relatou que TTC é fortemente absorvido por lipídios; sendo que não existem ainda estudos que relatam sobre a concentração de lipídios nos polens dessa.

**Tabela 3.** Média da viabilidade polínica de *L. indica* L. pela coloração em duas concentrações de TTC e quatro tempos de exposição.

Populações	Concentrações	Tempos			
		6	12	18	24
01	0,075%	0,00Bb	0,00Bb	0,00Bb	8,96Ba
	0,30%	73,53Ba	83,26Aa	72,53Ba	83,26Aa
02	0,075%	8,96Ab	0,30Bb	0,00Bb	0,00Bb
	0,30%	2,46Cb	57,73Ab	57,73Ab	33,43Bb
03	0,075%	3,40Bb	0,00Bb	0,00Bb	0,00Bb
	0,30%	8,46Bb	27,40Ac	27,40Ac	11,46Bc
CV (%)		7,42			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem pelo teste de scott-knott a nível de 5% de significância.

Na diluição de 0,30%, a População 01 demonstrou as maiores médias de exequibilidade. Dentre as Populações 1, 2 e 3 na proporção de 0,075%, apenas a População 2 demonstrou variação estatística no tempo de 6h, com média de 8,96%. Na porcentagem de 0,30 de TTC, a População 1 obteve as maiores porcentagens, evidenciado que essa concentração e período de contato da mistura são suficientes para estimar a exequibilidade polínica. Melo et al., (2016b), analisando a aferir da fertilidade masculina de rosedá rosa, também obteve boa pigmentação com TTC em concentração de 0,030%.

### Conclusões

O emprego dos corantes Alexander, Lugol 2%, Verde Malaquita 1% e do TTC para determinação da viabilidade polínica, mostrou-se eficientes na diferenciação dos pólenes férteis e inférteis, apresentando altas taxas de fertilização. No uso do TTC recomenda-se utilização na concentração de 0,30% durante 12h de exposição dos grãos de pólen, pois foi o período em que se notou maior média de coloração, tornando-se recomendado para verificação da fertilidade polínica da espécie.

### Agradecimentos

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Cod de Financiamento 001.

### Referências

BROWN, W. V.: A preliminary study of the staining of plant cells by tetrazolium chloride. *Bui. Torrey Bot. Cl.* v.81, p.127-136, 1954.

FARIAS, C. B. M.; RAMOS L. P. N.; MELLO, V. dos S. de; PRESTES, Z. M. da S. R.; KARSBURG, I. V. Análise da eficiência polínica de *Bisnagueira* mediante diferenciados métodos de pigmentação. *Agrarian academy*, Centro Científico Conhecer -

Goiânia, v. 5, n.10; p.1, 2018. Disponível em <<http://www.conhecer.org.br/Agrarian%20Academy/2018B/analise.pdf>>

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: Experimental designs package. R package version 1.1.2. 2013. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes/index.html>>.

GUERRA, M & SOUZA, M. J. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC, p. 201, 2002.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. Techniques for pollination biologists. Niwot Ridge: University Press of Colorado, p. 583, 1993.

LORENZO, J. M. S. 2012. *Lagerstroemia indica* L. disponível em: <<http://www.arbolesornamentales.es/Lagerstroemia%20indica.pdf>>.

MARTINS, L. A. R; LAVIOLA, B. G.; PRAÇA-FONTES, M. M. Viabilidade polínica de *Jatropha curcas* L.: uma comparação metodológica. In: Congresso Brasileiro de Mamona, 5; Simpósio Internacional de Oleaginosas energéticas 2. Fórum Capixaba de Pinhão Manso, 1. 2012, Guarapari. Desafios e Oportunidades: Anais... Campina Grande: Embrapa Algodão, 2012.

MELLO, V. S.; SANTOS, B. N. V.; MACEDO, W. A.; DAMASIO, J. F.; KARSBURG, I. V. Estimativa da viabilidade polínica de *Heliconia rostrata* L. (Heliconiaceae) por meio do teste colorimétrico de Tetrazólio. In: IV SEMINÁRIO DE BIODIVERSIDADE E AGROECOSSISTEMAS AMAZÔNICOS, Alta Floresta, MT. 2016. Anais do seminário de biodiversidade e agroecossistemas

amazônicos. Alta Floresta: UNEMAT, 2016a, p.693-697, 2016a.

MELO, V. S.; DAMASIO, J. F.; SANTOS, B. N. V.; MACEDO, A. M.; LEITE, D. M.; SANTOS, L. C. B.; KARSBURG, I. V. Estimativa dos grãos de pólen de Resedá Rosa em 2,3,5 Cloreto de Trifeniltetrazólio. Ciência & Tecnologia: Fatec-JB, Jaboticabal, v. 8, n.1, 2016b.

MUNHOZ, M.; LUZ, C. F. P.; FILHO, P. E. M.; BARTH, O. M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. Revista Brasil. Bot., v.31, n.2, p.209-214, abr.-jun. 2008. doi: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042008000200003>>.

OLIVEIRA, A. C. R.; CARVALHO, S. M. Arborização de Vias Públicas e Aspectos Sócio – Econômicos de três vilas de Ponta Grossa, PR. REVSBAU, Piracicaba – SP, v.5, n.3, p. 42—58, 2010. Disponível em: < [http://www.revsbau.esalq.usp.br/artigos\\_cientificos/artigo123-publicacao.pdf](http://www.revsbau.esalq.usp.br/artigos_cientificos/artigo123-publicacao.pdf)>.

PICCININI, F., FRESCURA, V. S., LAUGHINGHOUSE IV, H. D., Perez, N. B., & Tedesco, S. B. Pollen viability of *Eragrostis plana* genotypes from different geographic populations in Rio Grande do Sul. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 2012.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: < <https://www.Rproject.org/>. 2016>.

SCHMITT, K. F. M.; PAULA, R. P.; MORENO, E. C.; TIAGO, A. V.; ROSSI, A. A. B. Uso de testes colorimétricos na avaliação da viabilidade polínica do urucum (*Bixa orellana* L.). Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.22; 2015.

STIEHL-ALVES, E.M.; MARTINS, M.P. Biologia reprodutiva de *Acacia mearnsii* de Wild: receptividade de estigmas. Revista Árvore, Viçosa, MG, v.32, n.4, p.609-616, 2008.